

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Juni 2004 (17.06.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/050710 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C08B 31/02, 33/02, 35/02, A61K 47/48

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/013622

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. Dezember 2003 (03.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 56 558.9 4. Dezember 2002 (04.12.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SUPRAMOL PARENTERAL COLLOIDS GMBH [DE/DE]; Industriestr. 1-3, 61191 Rosbach-Rodheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SOMMERMEYER, Klaus [DE/DE]; In der Laubach 26, 61191 Rosbach v.d.H. (DE).

(74) Anwälte: LUDERSCHMIDT, Wolfgang usw.; John-F.-Kennedy-Strasse 4, 65189 Wiesbaden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ALDONIC ACID ESTERS, METHODS FOR PRODUCING THE SAME, AND METHODS FOR PRODUCING PHARMACEUTICAL ACTIVE INGREDIENTS COUPLED TO POLYSACCHARIDES OR POLYSACCHARIDE DERIVATIVES ON FREE AMINO GROUPS

(54) Bezeichnung: ALDONSÄURE-ESTER, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON MIT POLYSACCHARIDEN ODER POLYSACCHARID-DERIVATEN AN FREIEN AMINOGRUPPEN GEKOPPELTEN PHARMAZEUTISCHEN WIRKSTOFFEN

(57) Abstract: The invention relates to aldonic acid esters of starch fractions or starch fraction derivatives which are selectively oxidised on the reducing chain end to form aldonic acids, and to solids and solutions containing said aldonic acid esters. The invention also relates to methods for producing said aldonic acid esters, to methods for producing pharmaceutical active ingredients coupled to polysaccharides or polysaccharide derivatives on free amino functions, and to pharmaceutical active ingredients thus obtained.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Aldonsäure-Ester von selektiv am reduzierenden Kettenende zu Aldonsäuren oxidierten Stärkefraktionen oder Stärkefraktions-Derivaten, Feststoff und Lösungen, die diese Aldonsäure-Ester enthalten. Des weiteren beschreibt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Aldonsäure-Ester, Verfahren zur Herstellung von mit Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten an freien Aminofunktionen gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffen sowie hierdurch erhältliche pharmazeutische Wirkstoffe.

WO 2004/050710 A2

Aldonsäure-Ester, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verfahren zur Herstellung von mit Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten an freien Aminogruppen gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffen.

Die vorliegende Erfindung betrifft Aldonsäure-Ester, Feststoffe und Lösungen, die diese Ester enthalten sowie Verfahren zu ihrer Herstellung. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung von mit Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten an freien Aminogruppen gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffen, die unter Verwendung der Aldonsäure-Ester durchgeführt werden, sowie die pharmazeutischen Wirkstoffe, die durch diese Verfahren erhältlich sind.

Die Konjugation von pharmazeutischen Wirkstoffen insbesondere von Proteinen mit Polyethylenglycol-Derivaten ("PEGylierung") oder Polysacchariden wie Dextrane oder insbesondere Hydroxyethylstärke ("HESylierung") hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen mit der Zunahme an pharmazeutischen Proteinen aus der biotechnologischen Forschung.

Oft haben solche Proteine eine zu kurze biologische Halbwertszeit, welche durch Kopplung an die oben angeführten Polymeren-Verbindungen wie PEG oder HES gezielt verlängert werden kann. Durch die Kopplung können aber auch die antigenen Eigenschaften von Proteinen positiv beeinflusst werden. Im Falle von anderen pharmazeutischen Wirkstoffen kann durch die Kopplung die Wasserlöslichkeit erheblich vergrößert werden.

In DE 196 28 705 und DE 101 29 369 werden Verfahren beschrieben, wie die Kopplung mit Hydroxyethylstärke in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) über das entsprechende Aldonsäurelacton der Hydroxyethylstärke durchgeführt werden kann mit freien Aminogruppen von Hämoglobin bzw. Amphotericin B.

Da in wasserfreien, aprotischen Lösungsmitteln gerade im Falle der Proteine oft nicht gearbeitet werden kann, entweder aus Löslichkeitsgründen aber auch Gründen der Denaturierung der Proteine, stehen auch Kopplungsverfahren mit HES im wasserhaltigen Milieu zur Verfügung. Z.B. gelingt die Kopplung der am reduzierenden Kettenende selektiv zur Aldonsäure oxidierten Hydroxyethylstärke durch Vermittlung von wasserlöslichem Carbodiimid EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) (PCT/EP 02/02928). Sehr oft jedoch ist der Einsatz von Carbodiimiden mit Nachteilen behaftet, da Carbodiimide sehr häufig inter- oder intramolekulare Vernetzungsreaktionen der Proteine verursachen als Nebenreaktionen.

Im Falle von phosphatgruppenhaltigen Verbindungen wie Nukleinsäuren gelingt die Kopplung oft gar nicht, da die Phosphatgruppen mit EDC ebenfalls reagieren können (S.S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC-Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 1993, Seite 199).

In Anbetracht des diskutierten Standes der Technik lag der Erfindung die Aufgabe zugrunde, Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die unter Vermeidung der zuvor beschriebenen Nachteile die Kopplung von Polysacchariden oder deren Derivate an Aminogruppen-haltige Wirkstoffe, insbesondere an Proteine, in rein wässrigen Systemen oder auch in Lösungsmittelgemischen mit Wasser gezielt ermöglichen.

Ferner sollte eine solche Verbindung so beschaffen sein, dass eine möglichst quantitative Anbindung eines Wirkstoffes durch kovalente Bindung an ein Polysaccharid oder ein Polysaccharid-Derivat stattfindet.

Der Erfindung lag weiterhin die Aufgabe zugrunde, Verbindungen zu schaffen, die eine möglichst schonende Verknüpfung von einem Polysaccharid oder eines Derivats hiervon an den Wirkstoff ermöglichen. So sollte insbesondere die Struktur, die Aktivität und die Verträglichkeit des Wirkstoffes durch die Umsetzung möglichst wenig verändert werden. Beispielsweise sollten intra- und

intermolekulare Vernetzungsreaktionen vermieden werden. Darüber hinaus sollten auch Wirkstoffe verknüpft werden können, die Phosphatgruppen aufweisen.

Des weiteren war es mithin Aufgabe der vorliegenden Erfindung Verbindungen anzugeben, die eine möglichst selektive Kopplung an den Wirkstoff erlauben. So sollte insbesondere eine gezielte Stöchiometrie des Konjugats eingestellt werden können, wobei speziell die Herstellung von 1:1 Konjugate durch den Einsatz dieser Verbindungen ermöglicht werden sollte.

Schließlich lag der Erfindung die Aufgabe zugrunde ein möglichst einfaches und kostengünstiges Verfahren zur Herstellung solcher Verbindungen und Kopplungsprodukte von Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten mit Wirkstoffen zur Verfügung zu stellen.

Gelöst werden diese Aufgaben sowie weitere, die zwar nicht wörtlich genannt werden, sich aber aus den hierin diskutierten Zusammenhängen wie selbstverständlich ableiten lassen oder sich aus diesen zwangsläufig ergeben, mit den in Anspruch 1 beschriebenen Aldonsäure-Estern. Zweckmäßige Abwandlungen dieser erfindungsgemäßen Aldonsäure-Ester sowie haltbare und in Verfahren zur Herstellung von Konjugaten einsetzbare Aldonsäure-Ester werden in den auf Anspruch 1 rückbezogenen Unteransprüchen 2-17 unter Schutz gestellt.

Hinsichtlich eines Verfahrens zur Herstellung der Aldonsäure-Ester liefern die Ansprüche 18-27 eine Lösung der zugrunde liegenden Aufgabe.

Die Ansprüche 28-32 beschreiben Verfahren zur Herstellung Polysaccharid-Wirkstoff-Konjugate und die durch diese Verfahren erhältlichen pharmazeutischen Wirkstoffe.

Durch die Bereitstellung von Aldonsäure-Ester, die von selektiv am reduzierenden Kettenende zu Aldonsäuren oxidierten Polysacchariden oder Polysaccharide-Derivaten abgeleitet sind, gelingt es Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die

die zuvor genannten Aufgaben lösen. Solche Ester können als aktivierte Säuren aufgefasst werden. Sie setzen sich im wässrigen Milieu mit nukleophilen NH_2 -Gruppen zu (stabileren) Amiden um.

Des weiteren werden durch die vorliegende Erfindung unter anderem folgende Vorteile erzielt:

Die erfindungsgemäßen Aldonsäure-Ester ermöglichen eine leichte Anbindung eines Wirkstoffes durch kovalente Bindung an ein Polysaccharid oder ein Polysaccharid-Derivat stattfindet.

Die Aldonsäure-Ester der vorliegenden Erfindung können unter schonenden Bedingungen mit einem Wirkstoff umgesetzt werden. Hierbei wird insbesondere die Struktur, die Aktivität und die Verträglichkeit des Wirkstoffes durch die Umsetzung nur in einem geringen Umfang verändert. Hierdurch können unter anderem insbesondere intra- und intermolekulare Vernetzungsreaktionen vermieden werden. Des weiteren können pharmazeutische Wirkstoffe gekoppelt werden, die Phosphatgruppen aufweisen, ohne dass diese Gruppen verändert werden.

Die erfindungsgemäßen Aldonsäure-Ester erlauben eine sehr selektive Kopplung an den Wirkstoff. Des weiteren kann beispielsweise eine gezielte Stöchiometrie des gewünschten Konjugats eingestellt werden, wobei speziell die Herstellung von 1:1 Konjugate durch den Einsatz dieser Verbindungen ermöglicht wird.

Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung einfache und kostengünstige Verfahren zur Herstellung aktivierter Aldonsäure-Ester und Kopplungsprodukte von Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten mit Wirkstoffen zur Verfügung.

Die Aldonsäure-Ester der vorliegenden Erfindung sind von Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten abgeleitet, die am reduzierenden Kettenende

selektiv oxidiert werden können. Derartige Polysaccharide, sowie hieraus erhältliche Derivate, sind in der Fachwelt weithin bekannt und können kommerziell erhalten werden. Polysaccharide sind makromolekulare Kohlenhydrate, deren Moleküle eine große Zahl (mind. >10, gewöhnlich jedoch erheblich mehr) glykosidisch miteinander verknüpfter Monosaccharid-Moleküle (Glykose) aufweisen. Das Gewichtsmittel des Molekulargewichts bevorzugter Polysaccharide liegt vorzugsweise im Bereich von 1500 bis 1000000 Dalton, besonders bevorzugt 2000 bis 300000 Dalton und ganz besonders bevorzugt im Bereich von 2000 bis 50000 Dalton. Das Molekulargewicht M_w mit üblichen Verfahren bestimmt werden. Hierzu gehören beispielsweise wässrige GPC, HPLC, Lichtstreuung und dergleichen.

Über das Molekulargewicht des Polysaccharidrests kann unter anderem die Verweilzeit im Körper verändert werden.

Zu den bevorzugten Polysacchariden gehören Stärke sowie die durch Hydrolyse erhältlichen Stärkefraktionen, die als Abbauprodukte von Stärke aufgefasst werden können. Stärke wird üblich in Amylose und Amylopektin unterteilt, die sich im Verzweigungsgrad unterscheiden. Erfindungsgemäß ist Amylopektin besonders bevorzugt.

Unter Amylopektinen versteht man dabei zunächst ganz allgemein verzweigte Stärken oder Stärkeprodukte mit α -(1-4)- und α -(1-6)-Bindungen zwischen den Glucosemolekülen. Die Verzweigungen der Kette erfolgen dabei über die α -(1-6)-Bindungen. Diese sind bei natürlich vorkommenden Amylopektinen etwa alle 15-30 Glucosesegmente unregelmäßig vorhanden. Das Molekulargewicht von natürlichem Amylopektin liegt sehr hoch im Bereich von 10^7 bis zu 2×10^8 Dalton. Man geht davon aus, dass auch Amylopektin in gewissen Grenzen Helices bildet.

Man kann für Amylopektine einen Verzweigungsgrad definieren. Das Maß für die Verzweigung ist das Verhältnis der Zahl von Molekülen Anhydroglucose,

die Verzweigungspunkte (α -(1-6)-Bindungen) tragen, zur Gesamtzahl Moleküle der Anhydroglucose des Amylopektins, wobei dieses Verhältnis in mol-% ausgedrückt wird. In der Natur auftretendes Amylopektin weist Verzweigungsgrade von ca. 4 mol-%. Bevorzugt zur Herstellung der Aldonsäure-Ester eingesetzte Amylopektine weisen eine mittlere Verzweigung im Bereich von 5 bis 10 mol% auf.

Des weiteren können hypervverzweigte Amylopektine eingesetzt werden, die einen über den aus der Natur für Amylopektine bekannten Verzweigungsgrad signifikant hinausgehenden Verzweigungsgrad aufweisen. Dabei handelt es sich beim Verzweigungsgrad in jedem Falle um einen Mittelwert (mittleren Verzweigungsgrad), da Amylopektine polydisperse Substanzen sind.

Solche hypervverzweigte Amylopektine weisen signifikant höhere Verzweigungsgrade, ausgedrückt als mol-% der Verzweigungsanhydroglucosen, auf im Vergleich zu unverändertem Amylopektin bzw. Hydroxyethylstärke und sind demzufolge in ihrer Struktur dem Glycogen ähnlicher.

Der mittlere Verzweigungsgrad der hypervverzweigten Amylopektine liegt üblich im Bereich zwischen > 10 und 25 mol%. Dies bedeutet, dass diese Amylopektine im Mittel etwa alle 10 bis 4 Glucoseeinheiten eine α -(1-6)-Bindung und damit einen Verzweigungspunkt aufweisen.

Eine bevorzugt im medizinischen Bereich einsetzbare Amylopektintype kennzeichnet sich durch einen Verzweigungsgrad zwischen 11 und 16 mol-%.

Weitere bevorzugte hypervverzweigte Amylopektine besitzen einen Verzweigungsgrad im Bereich zwischen 13 und 16 mol-%.

Die in der Erfindung einsetzbaren Amylopektine besitzen vorzugsweise einen Wert für das Gewichtsmittel des Molekulargewichts M_w im Bereich von 2.000

bis 800.000 Dalton, insbesondere 2.000 bis 300.000 und besonders bevorzugt 2.000 bis 50.000 Dalton.

Die zuvor dargelegten Stärken können kommerziell erhalten werden. Des weiteren ist deren Gewinnung literaturbekannt. So kann Stärke, insbesondere aus Kartoffeln, Tapioka, Maniok, Reis, Weizen oder Mais gewonnen werden. Die aus diesen Pflanzen erhaltenen Stärken werden vielfach zunächst einer hydrolytischen Abbaureaktion unterworfen. Dabei wird das Molekulargewicht von etwa 20.000.000 Dalton auf mehrere Millionen Dalton reduziert, wobei ein weiterer Abbau des Molekulargewichts auf die zuvor genannten Werte ebenfalls bekannt ist. Besonders bevorzugt können unter anderem Wachsmaisstärke-Abbaufractionen zur Herstellung der erfindungsgemäßen Aldonsäure-Ester eingesetzt werden.

Die zuvor dargelegten hypervverzweigten Stärkefraktionen werden unter anderem in der deutschen Patentanmeldung 102 17 994 beschrieben.

Des weiteren können auch Derivate von Polysacchariden zur Herstellung der erfindungsgemäßen Aldonsäure-Ester eingesetzt werden. Zu diesen gehören insbesondere Hydroxyalkylstärken, beispielsweise Hydroxyethylstärke und Hydroxypropylstärke, die durch Hydroxyalkylierung aus den zuvor dargelegten Stärken, insbesondere aus Amylopektin gewonnen werden können. Hiervon ist Hydroxyethylstärke (HES) bevorzugt.

Vorzugsweise wird erfindungsgemäß eine HES eingesetzt, die das hydroxethylierte Derivat des in Wachsmaisstärke zu über 95 % vorkommenden Glucosepolymers Amylopektin ist. Amylopektin besteht aus Glucoseeinheiten, die in α -1,4-glykosidischen Bindungen vorliegen und α -1,6-glykosidische Verzweigungen aufweisen.

HES weist vorteilhafte rheologische Eigenschaften auf und wird zur Zeit als Volumenersatzmittel und zur Hämodilutionstherapie klinisch eingesetzt

(Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, Vol. 8 (8, 1987) Seite 271 – 278 und Weidler et. al., Arzneimittelforschung / Drug Res., 41, (1991) Seite 494 – 498).

HES wird im wesentlichen über das gewichtsgemittelte mittlere Molekulargewicht M_w , das Zahlenmittel des mittleren Molekulargewichts M_n , die Molekulargewichtsverteilung und den Substitutionsgrad gekennzeichnet. Die Substitution mit Hydroxyethylgruppen in Ätherbindung ist dabei an den Kohlenstoffatomen 2, 3 und 6 der Anhydroglucoseeinheiten möglich. Der Substitutionsgrad kann dabei als DS ("degree of substitution"), welcher auf den Anteil der substituierten Glucosemoleküle aller Glucoseeinheiten Bezug nimmt, oder als MS ("molar substitution") beschrieben werden, womit die mittlere Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Glucoseeinheit bezeichnet wird.

Der Substitutionsgrad MS (molar substitution) ist definiert als die durchschnittliche Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Anhydroglucoseeinheit. Er wird ermittelt aus der Gesamtanzahl der Hydroxyethylgruppen in einer Probe, beispielsweise nach Morgan, durch Ätherspaltung und anschließender quantitativer Bestimmung von Ethyliodid und Ethylen, die hierbei gebildet werden.

Hingegen ist der Substitutionsgrad DS (degree of substitution) definiert als der Anteil der substituierten Anhydroglucoseeinheiten aller Anhydroglucoseeinheiten. Ihn kann man bestimmen aus der gemessenen Menge der unsubstituierten Glucose nach Hydrolyse einer Probe. Aus diesen Definitionen ergibt sich, dass $MS > DS$. Für den Fall, dass nur Monosubstitution vorliegt, also jede substituierte Anhydroglucoseeinheit nur eine Hydroxyethylgruppe trägt, ist $MS = DS$.

Ein Hydroxyethylstärkerest weist bevorzugt einen Substitutionsgrad MS von 0,1 bis 0,8 auf. Besonders bevorzugt weist der Hydroxyethylstärkerest einen Substitutionsgrad MS von 0,4 bis 0,7 auf.

Die Reaktivität der einzelnen Hydroxygruppen in der unsubstituierten Anhydroglucoseeinheit gegenüber Hydroxyethylierung ist je nach Reaktionsbedingungen unterschiedlich. Innerhalb gewisser Grenzen ist dadurch das Substitutionsmuster, also die einzelnen, unterschiedlich substituierten Anhydroglucosen, die statistisch auf die einzelnen Polymerelemente verteilt sind, beeinflussbar. Vorteilhaft werden überwiegend die C₂- und die C₆-Position hydroxyethyliert, wobei die C₆-Position aufgrund ihrer leichteren Zugänglichkeit häufiger substituiert wird.

Vorzugsweise verwendet werden im Rahmen dieser Erfindung überwiegend in C₂-Position substituierte Hydroxyethylstärken (HES), die möglichst homogen substituiert sind. Die Herstellung solcher HES wird in EP 0 402 724 B2 beschrieben. Sie sind innerhalb einer physiologisch vernünftigen Zeit restlos abbaubar und weisen auf der anderen Seite dennoch ein steuerbares Eliminationsverhalten auf. Die überwiegende C₂-Substitution macht die Hydroxyethylstärke relativ schwierig abbaubar für α -Amylase. Es ist von Vorteil, dass möglichst keine innerhalb der Polymerelemente hintereinander substituieren Anhydroglucoseeinheiten auftreten, um die restlose Abbaubarkeit zu gewährleisten. Weiterhin besitzen solche Hydroxyethylstärken trotz der niedrigen Substitution eine ausreichend hohe Löslichkeit in wässrigem Medium, so dass die Lösungen auch über längere Zeiträume stabil sind und sich keine Agglomerate bzw. Gele bilden.

Bezogen auf die Hydroxyethylgruppen der Anhydroglucoseeinheiten weist ein Hydroxyethylstärkerest bevorzugt ein Verhältnis von C₂:C₆-Substitution im Bereich von 2 bis 15 auf. Besonders bevorzugt beträgt das Verhältnis von C₂:C₆-Substitution 3 bis 11.

Die selektive Oxidation der Aldehydgruppe der zuvor dargelegten Polysaccharide bzw. Polysaccharid-Derivate zur Aldonsäure ist an sich bekannt. Diese kann durch milde Oxidationsmittel, beispielsweise Iod/Kaliumhydroxid entsprechend DE 196 28 705 A1, oder durch Enzyme erfolgen.

Zur Umsetzung kann die freie Aldonsäure eingesetzt werden. Des weiteren können auch Salze eingesetzt werden. Hierzu gehören insbesondere die Alkalisalze, wie beispielsweise das Natrium- und/oder das Kaliumsalz der Aldonsäuren.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Aldonsäure-Ester werden Alkohole eingesetzt. Der Begriff Alkohol umfasst Verbindungen, die HO-Gruppen aufweisen. Diese HO-Gruppen können unter anderem an ein Stickstoffatom oder an einen Phenylrest gebunden sein.

Bevorzugt werden azide Alkohole eingesetzt, die in der Fachwelt bekannt sind. Hierzu gehören unter anderem N-Hydroxy-Imide, beispielsweise N-Hydroxy-Succinimid und Sulfo-N-Hydroxysuccinimid, substituierte Phenole und Hydroxy-Azole, beispielsweise Hydroxy-Benzotriazol, wobei N-Hydroxy-Succinimide und Sulfo-N-Hydroxysuccinimid besonders bevorzugt sind.

Weitere geeignete azide Alkohole zur Herstellung der erfindungsgemäßen Aldonsäure-Ester sind in der Literatur aufgeführt. (V.H.L. Lee. Ed. Peptide and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, 1991, S. 65).

Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Alkohole eingesetzt, deren HO-Gruppe einen pK_s -Wert im Bereich von 6 bis 12, bevorzugt im Bereich von 7 bis 11 aufweist. Dieser Wert bezieht sich auf die bei 25°C bestimmte Säure-Dissoziationskonstante, wobei dieser Wert vielfach in der Literatur aufgeführt ist.

Das Molekulargewicht des Alkohols liegt vorzugsweise im Bereich von 80 bis 500 g/mol, insbesondere 100 bis 200 g/mol.

Der Alkohol kann als freier einer Reaktionsmischung zugegeben werden. Des weiteren können auch Verbindungen zur Reaktion verwendet werden, die bei Zugabe von Wasser, ggf. unter Säurekatalyse, Alkohol freisetzen.

Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden zur Umsetzung mit der Aldonsäure oder einem Aldonsäuresalz Kohlendioxid eingesetzt. Diese Verbindungen ermöglichen eine besonders schnelle und schonende Reaktion, wobei lediglich Kohlendioxid bzw. Carbonate, Alkohole und der gewünschte Aldonsäure-Ester gebildet werden.

Bevorzugte Kohlendioxid sind unter anderem N,N-Succinimidylcarbonat und Sulfo-N,N-Succinimidylcarbonat.

Diese Kohlendioxid können in relativ geringen Mengen eingesetzt werden. So kann der Kohlendioxid in 1- bis 3-molarem Überschuss, bevorzugt 1 bis 1,5 molarem Überschuss, bezogen auf die Aldonsäure und/oder das Aldonsäuresalz, eingesetzt werden. Die Reaktionsdauer bei Verwendung von Kohlendioxid ist relativ gering. So kann die Reaktion vielfach nach 2 Stunden, bevorzugt nach 1 Stunde beendet werden.

Die Umsetzung zum Aldonsäureester findet bevorzugt in einem wasserfreien aprotischen Lösungsmittel statt. Der Wassergehalt sollte vorzugsweise höchstens 0,5 Gew.-%, besonders bevorzugt höchstens 0,1 Gew.-% betragen. Geeignete Lösungsmittel sind unter anderem Dimethylsulfoxid (DMSO), N-Methylpyrrolidon, Dimethylacetamid (DMA) und/oder Dimethylformamid (DMF).

Die Veresterungsreaktion ist an sich bekannt, wobei jedes Verfahren eingesetzt werden kann. Die Umsetzung zum Aldonsäure-Ester kann unter anderem unter Verwendung aktivierenden Verbindungen erfolgen. Bei Einsatz des freien Alkohols ist eine derartige Vorgehensweise empfehlenswert. Zu den aktivierenden Verbindungen gehören insbesondere Carbodiimid, wie beispielsweise

Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC).

Bei Verwendung des freien Alkohols kann dieser in einem molaren Überschuss eingesetzt werden. Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Alkoholkomponente vorzugsweise in 5 bis 50-fachem molaren Überschuss, besonders bevorzugt 8 bis 20-fachen Überschuss bezogen auf die Aldonsäure und/oder das Aldonsäure-Derivat, eingesetzt.

Die Umsetzung zum Aldonsäure-Ester gelingt unter schonenden Bedingungen. So können die zuvor beschriebenen Reaktionen bei Temperaturen vorzugsweise im Bereich von 0°C bis 40°C, besonders bevorzugt 10°C bis 30°C durchgeführt werden.

Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung erfolgt die Umsetzung bei einer geringen Basenaktivität. Die geringe Basenaktivität kann durch Zugabe der Reaktionsmischung in einen 10-fachen Überschuss Wasser gemessen werden. Hierbei weist das Wasser vor Zugabe einen pH-Wert von 7,0 bei 25°C auf, wobei das Wasser im wesentlichen keinen Puffer enthält. Durch Messung des pH-Wertes bei 25°C nach Zugabe der Reaktionsmischung erhält man die Basenaktivität der Reaktionsmischung. Vorzugsweise weist diese Mischung nach Zugabe einen pH-Wert von höchstens 9,0, besonders bevorzugt von höchstens 8,0 und besonders bevorzugt von höchstens 7,5 auf.

Die Umsetzung mit HES-Aldonsäuren, z.B. mit N-Hydroxy-Succinimid, gelingt in trockenem DMA unter Wasserausschluss mit EDC in glatter Reaktion bei Raumtemperatur zum HES-Säure-N-Hydroxy-Succinimid-Ester. Dabei ist insbesondere überraschend, dass keine Nebenreaktion der HES-Moleküle eintritt über die Reaktion der im extremen Überschuss vorliegenden OH-Gruppen der Anhydroglucosen mit EDC sowie die Umlagerungsreaktion des primär gebildeten O-Acyl-Isoharnstoffs aus EDC und der Aldonsäure zum entsprechenden N-Acyl-Harnstoff unterdrückt wird.

Die durch die zuvor beschriebene Umsetzung erhaltenen Lösungen können ohne Isolation der Aldonsäure-Ester in den Kopplungsreaktionen eingesetzt werden. Da in der Regel das Volumen der voraktivierten Aldonsäure im aprotischen Lösungsmittel klein ist im Vergleich mit dem im Puffervolumen gelösten Zielprotein wirken sich die Mengen an aprotischem Lösungsmittel meistens nicht störend aus. Bevorzugte Lösungen umfassen mindestens 10 Gew.-% Aldonsäure-Ester, bevorzugt mindestens 30 Gew.-% Aldonsäure-Ester und besonders bevorzugt mindestens 50 Gew.-% Aldonsäure-Ester.

Die Aldonsäure-Ester können aus der Lösung in aprotischem Lösungsmittel, beispielsweise DMA durch bekannte Fällungsmittel, wie beispielsweise trockenes Ethanol, Isopropanol oder Aceton gefällt und durch mehrfaches wiederholen des Vorganges gereinigt werden. Bevorzugte Feststoffe umfassen mindestens 10 Gew.-% Aldonsäure-Ester, bevorzugt mindestens 30 Gew.-% Aldonsäure-Ester und besonders bevorzugt mindestens 50 Gew.-% Aldonsäure-Ester.

Solche Aldonsäure-Ester können dann in Substanz isoliert zur Kopplung, beispielsweise zur HESylierung verwendet werden. Dabei treten dann keine Nebenreaktionen wie oben beschreiben mit EDC-aktivierter Säure auf.

Des weiteren kann zur Kopplung eine Lösung der aktivierten Aldonsäure zu einer wässrigen Lösung des pharmazeutischen Wirkstoffs, die vorzugsweise gepuffert ist, bei einem geeigneten pH-Wert zugegeben werden. Die pharmazeutischen Wirkstoffe umfassen mindestens eine Aminogruppe, die zum Aldonsäureamid umgesetzt werden kann. Zu den bevorzugten Wirkstoffen gehören Proteine und Peptide.

Der pH-Wert der Umsetzung ist von den Eigenschaften des Wirkstoffs abhängig. Vorzugsweise, falls dies möglich ist, liegt der pH-Wert im Bereich von 7 bis 9, besonders bevorzugt 7,5 bis 8,5.

Die Kopplung findet im allgemeinen bei Temperaturen im Bereich von 0°C bis 40°C, bevorzugt 10°C bis 30°C statt, ohne dass hierdurch eine Beschränkung erfolgen soll. Die Reaktionsdauer kann durch geeignete Verfahren leicht ermittelt werden. Im allgemeinen liegt die Reaktionszeit im Bereich von 1 Stunde bis 100 Stunden, vorzugsweise 20 Stunden bis 48 Stunden.

Der Aldonsäure-Ester kann in einem Überschuss in Bezug auf den pharmazeutischen Wirkstoff eingesetzt werden. Vorzugsweise wird der Aldonsäure-Ester in 1 bis 5-fachem molaren Überschuss, besonders bevorzugt 1,5 bis 2-fachen Überschuss bezogen auf den pharmazeutischen Wirkstoff eingesetzt.

Als Nebenprodukt fällt bei der oben genannten Umsetzung im wesentlichen nur der Alkohol, beispielsweise N-Hydroxy-Succinimid an, welches leicht vom Kopplungsprodukt abgetrennt werden kann, z. B. durch Ultrafiltration. Als Nebenreaktion kann eine Verseifung mit Wasser auf zur freien Säure und zum freien Alkohol auftreten. Besonders überraschend ist daher, dass die erfindungsgemäßen Aldonsäure-Ester zu einem großen Teil eine Kopplungsreaktion mit einem pharmazeutischen Wirkstoff eingeht. Dies ergibt sich aus den Beispielen, insbesondere durch die in den Figuren dargestellten Chromatogramme.

- Abb. 1 MALLS-GPC-Chromatogramm des nicht umgesetzten bovinen Albumins (BSA). Monomeres und dimeres Albumin sind klar getrennt.
- Abb. 2 MALLS-GPC-Chromatogramm von der nicht umgesetzten HES-10/0,4-succinimidylester.
- Abb. 3 MALLS-GPC-Chromatogramm des Reaktionsproduktes von HES-10/0,4-succinimidylester und BSA. Gezeigt werden die Signale der 3-fach Detektion von Refraktionsindex (RI), UV-Detektor sowie das Lichtstreuungssignal bei 90°.

Abb. 4 MALLS-GPC-Chromatogramm des Reaktionsproduktes von HES-10/0,4-succinimidylester und BSA, in der Darstellung molekular Masse gegen Zeit.

Nachfolgend wird die Erfindung durch Beispiele und Vergleichsbeispiele eingehender erläutert, ohne dass die Erfindung auf diese Beispiele beschränkt werden soll.

Beispiele und Herstellverfahren

Beispiel 1

Herstellung von HES 10/0,4 – Säureester mit N-Hydroxy-Succinimid

5 g getrocknete, am terminalen reduzierenden Kettenende selektiv nach DE 196 28 705 oxidierte Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht $M_w = 10.000$ Dalton und einem Substitutionsgrad $MS = 0,4$ werden in 30 ml trockenem Dimethylacetamid bei 40 °C gelöst und nach Abkühlen der Lösung mit der 10fachen molaren Mengen N-Hydroxy-Succinimid versetzt unter Feuchtigkeitsausschluß. Danach wird die zur HES-Säure äquimolare Menge EDC portionsweise zugegeben und 24 Stunden nach Zugabe der Reaktionsansatz ausreagieren gelassen. Das Reaktionsprodukt wird anschließend mit trockenem Aceton gefällt und zur Reinigung mehrfach umgefällt.

Beispiel 2

Herstellung von Hes 10/0,4 – Säure gekoppeltem Myoglobin

15 mg Myoglobin werden in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit Natronlauge auf 7,5 eingestellt. Zu der Lösung werden 1,5 g HES 10/0,4 – Säure N-Hydroxy-Succinimid, hergestellt nach Beispiel 1, über 1 Stunde

portionsweise zugegeben und der pH-Wert konstant bei 7,5 gehalten durch Zugabe von Natronlauge.

Der Ansatz wird über Nacht rühren gelassen.

Die Bildung von hesyliertem Myoglobin wird über Gel-Permeationschromatographie mit einer Ausbeute von 70 %, bezogen auf das eingesetzte Myoglobin, bestimmt.

Beispiel 3

Herstellung von HES 10/0,4 – Säureester mit N'N-Disuccinimidylcarbonat

0,02 mmol (entsprechend 0,14 g) getrocknete HES 10/0,4 – Säure werden in 2 mL getrocknetem Dimethylformamid gelöst unter Feuchtigkeitsausschluß.

Zur Lösung werden 0,02 mmol N'N-Disuccinimidylcarbonat gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Rühren ausreagieren lassen.

Beispiel 4

Herstellung des Kopplungsproduktes von HES 10/0,4 – Säure mit bovinem Serumalbumin

50 mg bovines Serumalbumin (BSA entsprechend 0,7 μ mol) werden in 6 mL einer 0,3 molaren Bicarbonatlösung mit pH 8,4 gelöst. Zur Lösung wird der Ansatz gemäß Beispiel 3 gegeben und 2 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur ausreagieren gelassen.

Der Nachweis der gelungenen Reaktion erfolgt durch Niederdruck-HPGPC mit Mehrfachdetektion (UV 280 nm, MALLS-Lichtstreuendetektor (MALLS = multi angle laser light scattering), RI-Detektor).

Die Abbildungen 1 bis 4 zeigen im Vergleich die Chromatogramme der nicht umgesetzten HES 10/0,4 – succinimidylester, das Ausgangsprodukt BSA sowie den Reaktionsansatz.

Die gelungene Reaktion ergibt sich durch eine signifikante Abnahme des BSA-Peaks und das Auftreten eines höhermolekularen Peaks, welcher bei 280 nm detektiert wird.

Beispiel 5

Herstellung von HES 50/0,7 – Säureester mit N'-N-Disuccinimidylcarbonat

0,02 mmol (0,5 g) getrocknete HES 50/0,7 – Säure werden in 2 mL getrocknetem Dimethylformamid gelöst unter Feuchtigkeitsausschluss.

Zur Lösung werden 0,02 mmol N'-N-Disuccinimidylcarbonat gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Rühren ausreagieren gelassen.

Beispiel 6

Herstellung von HES 50/0,7 Kopplungsprodukt mit BSA

50 mg bovines Serumalbumin BSA (0,7 µmol) werden in 6 ml einer 0,3 molaren Bicarbonatlösung mit pH 8,4 gelöst. Zur Lösung wird die Lösung der aktivierten HES 50/0,7 – Säure gemäß Beispiel 5 gegeben und 2 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur ausreagieren gelassen.

Die analytische Kontrolle des Reaktionsansatzes erfolgt über Niederdruck-HPGPC mit Dreifachdetektion wie im Beispiel 4 beschrieben.

Die gelungene Reaktion ergibt sich aus einer Abnahme des Signals bei 280 nm des nicht umgesetzten BSA's und das entsprechende Auftreten des zu höheren Molekulargewichten versetzten Signals für das Kopplungsprodukt. Die Verschiebung ist entsprechend dem höheren Molekulargewicht der HES-Säure verglichen mit dem Beispiel 4 vergrößert.

Patentansprüche

1. Aldonsäure-Ester von selektiv am reduzierenden Kettenende zu Aldonsäuren oxidierten Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten.
2. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Polysaccharide oder Polysaccharid-Derivate Stärkefraktionen oder Stärkefraktions-Derivate sind.
3. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Stärkefraktionen Abbaufractionen des Amylopektins sind.
4. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Abbaufractionen des Amylopektins durch Säureabbau und/oder Abbau durch α -Amylase von Wachsmaisstärke gewonnen werden.
5. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Stärkefraktionen ein mittleres Molekulargewicht Mw von 2.000 – 50.000 Dalton aufweisen und eine mittlere Verzweigung von 5 – 10 mol% α -1,6-glykosidischen Bindungen.
6. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Stärkefraktionen ein mittleres Molekulargewicht Mw von 2.000 – 50.000 Dalton aufweisen und eine mittlere Verzweigung im Bereich von >10 bis 25 mol% α -1,6-glykosidischen Bindungen.
7. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Stärkefraktions-Derivate Hydroxyethyl-Derivate von Abbaufractionen der Wachsmaisstärke sind.
8. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das mittlere Molekulargewicht Mw der Hydroxyethylstärke-Fractionen im

Bereich von 2 – 300.000 Dalton liegt und der Substitutionsgrad MS zwischen 0,1 und 0,8 liegt sowie das C2/C6-Verhältnis der Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2 und C6 der Anhydroglucosen zwischen 2 und 15 liegt.

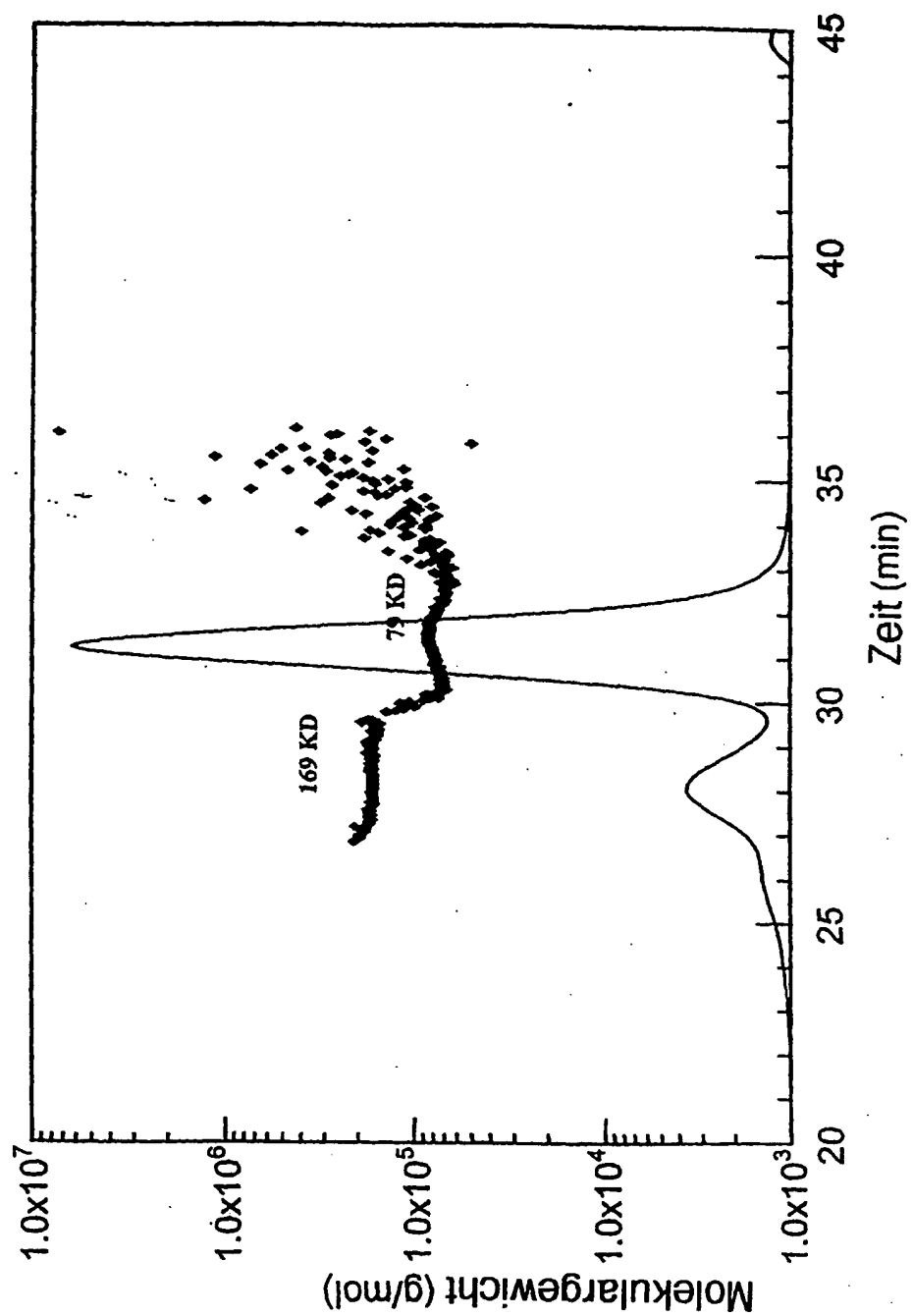
9. Aldonsäure-Ester gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Alkohol, von dem die Alkoholkomponente des Aldonsäure-Esters abgeleitet ist, ein Molekulargewicht im Bereich von 80 bis 500 g/mol aufweist.
10. Aldonsäure-Ester gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Alkohol, von dem die Alkoholkomponente des Aldonsäure-Esters abgeleitet ist, einen pK_s -Wert im Bereich von 6 bis 12 aufweist.
11. Aldonsäure-Ester gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Alkohol, von dem die Alkoholkomponente des Aldonsäure-Esters abgeleitet ist, des Aldonsäure-Esters eine HO-N-Gruppe oder eine Phenolgruppe umfasst.
12. Aldonsäure-Ester gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Alkohol, von dem die Alkoholkomponente des Aldonsäure-Esters abgeleitet ist, ausgewählt ist aus N-Hydroxy-Succinimid, Sulfo-N-Hydroxysuccinimid, substituierte Phenole und Hydroxy-Benzotriazol.
13. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Alkohol, von dem die Alkoholkomponente des Aldonsäure-Esters abgeleitet ist, N-Hydroxy-Succinimid und Sulfo-N-Hydroxysuccinimid ist.
14. Feststoff umfassend mindestens einen Aldonsäure-Ester gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13.

15. Lösung umfassend mindestens einen Aldonsäure-Ester gemäß einem mindestens der Ansprüche 1 bis 13.
16. Lösung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung mindestens ein organisches Lösungsmittel umfasst.
17. Lösung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung höchstens 0,5 Gew.-% Wasser umfasst.
18. Lösung gemäß mindestens einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung mindestens ein aprotisches Lösungsmittel umfasst.
19. Lösung gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO), N-Methylpyrrolidon, Dimethylacetamid (DMA) und/oder Dimethylformamid (DMF) umfasst.
20. Verfahren zur Herstellung von Aldonsäure-Ester gemäß mindestens einem der Anspruch 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Aldonsäure und/oder ein Aldonsäure-Derivat mit mindestens einer Alkoholkomponenten in aprotischen Lösungsmittel umgesetzt wird.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Alkoholkomponente in 5 bis 50-fachem molaren Überschuss, bezogen auf die Aldonsäure und/oder das Aldonsäure-Derivat, eingesetzt wird.
22. Verfahren gemäß Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung unter Verwendung von mindestens einem aktivierenden Reagenz erfolgt.

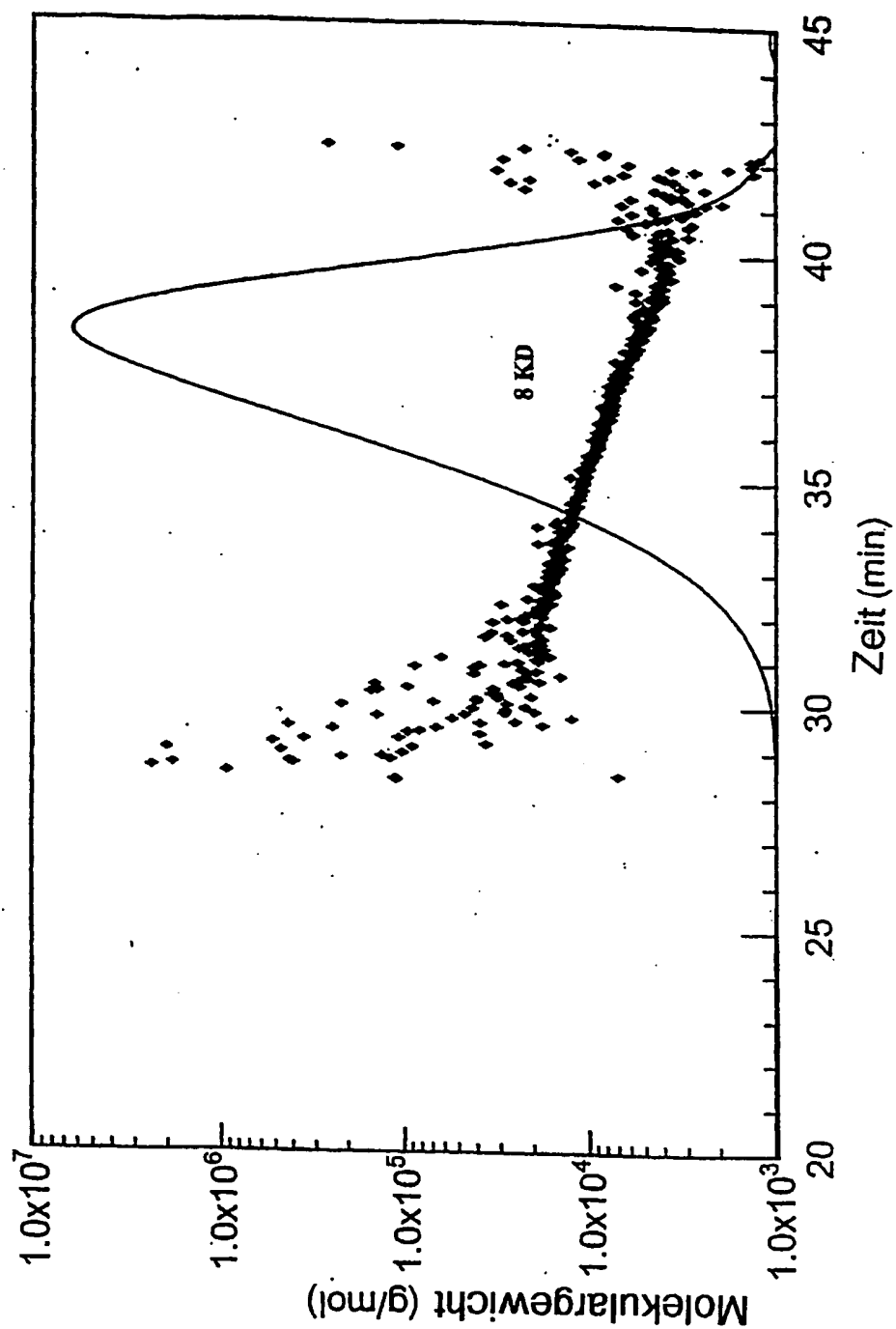
23. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das aktivierende Reagenz mindestens ein Carbodiimid umfasst.
24. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass das aktivierende Reagenz in 1- bis 3-molarem Überschuss, bezogen auf die Aldonsäure und/oder das Aldonsäure-Derivat, eingesetzt wird.
25. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 20 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung eingesetzt wird, die eine Alkoholkomponente zur Umsetzung mit der Aldonsäure oder dem Aldonsäurederivat freisetzt.
26. Verfahren gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass ein Kohlensäurediester eingesetzt wird.
27. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 20 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur im Bereich von 0 bis 40°C erfolgt.
28. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 20 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer geringen Basenaktivität erfolgt.
29. Verfahren zur Herstellung von mit Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten an freien Aminofunktionen gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffen, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Aldonsäure-Ester gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 mit einem pharmazeutischen Wirkstoff umgesetzt, der mindestens eine Aminogruppe aufweist.
30. Verfahren gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in wässrigem Medium erfolgt.

31. Verfahren gemäß Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert des wässrigen Mediums im Bereich von 7 bis 9 liegt.
32. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur im Bereich von 0°C bis 40°C erfolgt.
33. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 29 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass der pharmazeutische Wirkstoff ein Polypeptid oder ein Protein ist.
34. Pharmazeutischer Wirkstoff erhältlich durch ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 29 bis 33.

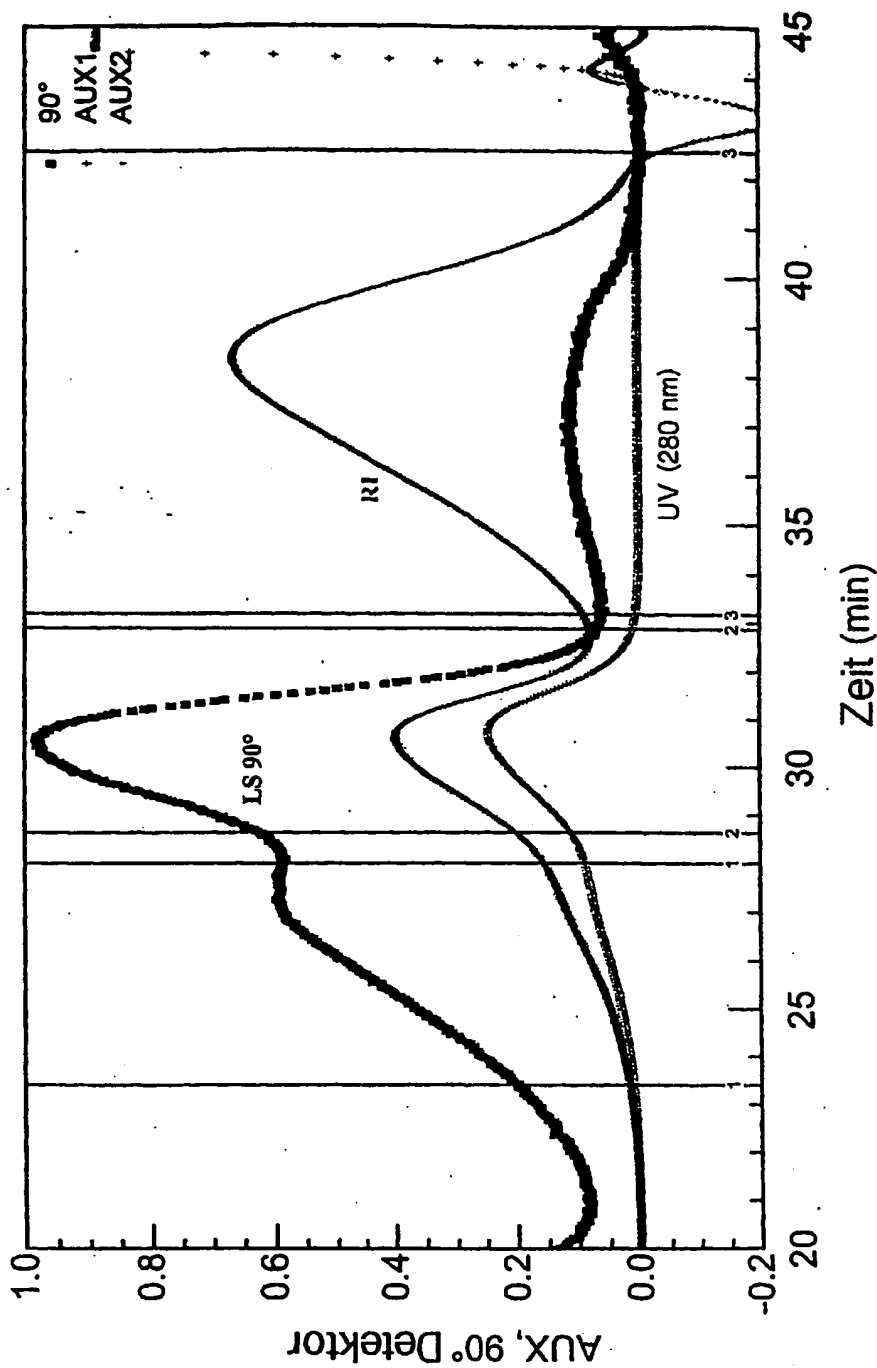
Figur 1



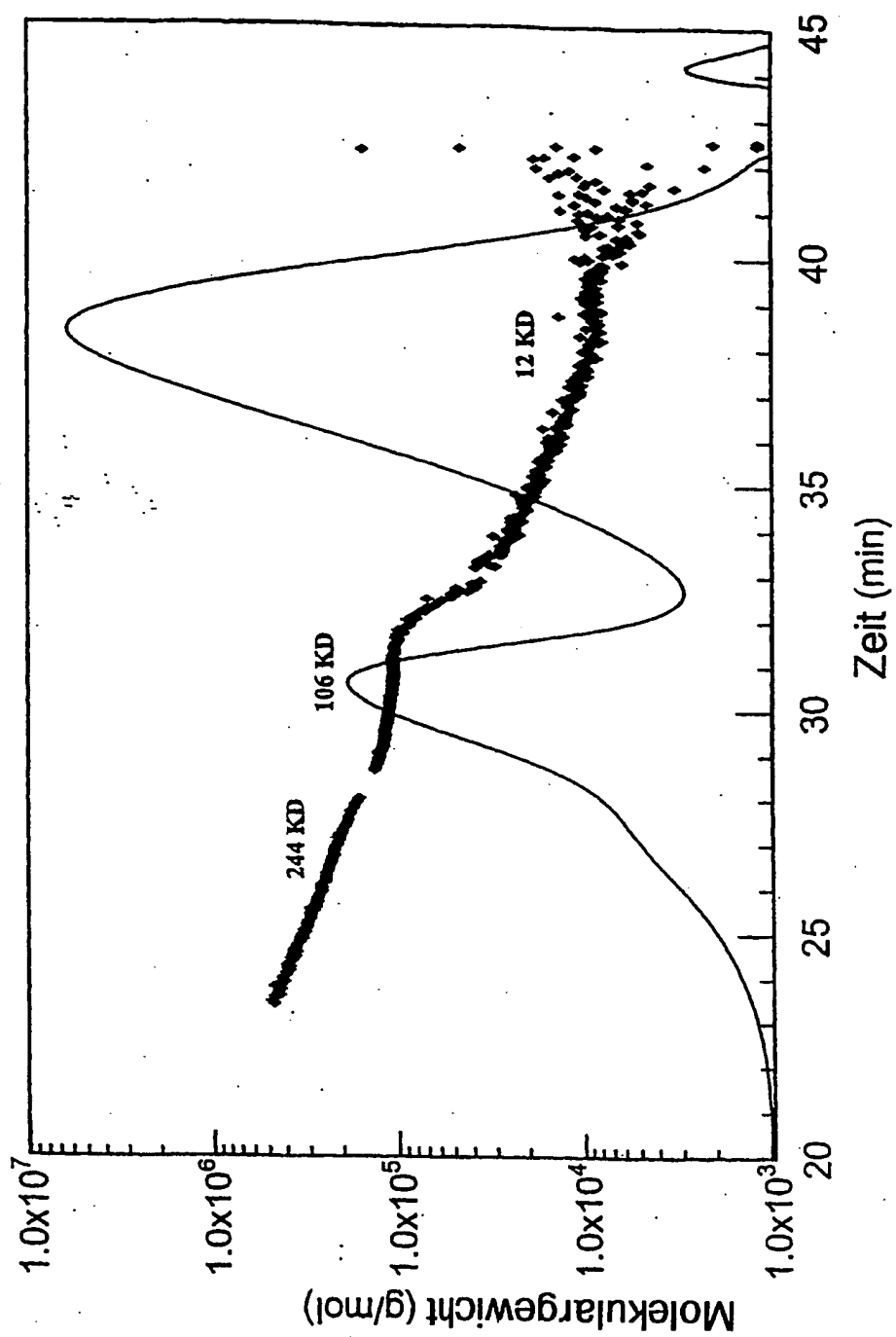
Figur 2



Figur 3



Figur 4



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.